

© ДЕНИСЕНКО А.Г., 2011

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА В-ЛИМФОЦИТОВ МЕТОДОМ ФЕНОТИПИРОВАНИЯ С АНТИ-CD22 ДИАГНОСТИКУМОМ В РАЗЛИЧНЫЕ ПРОМЕЖУТКИ ПОСЛЕ НАСТУПЛЕНИЯ СМЕРТИ

ДЕНИСЕНКО А.Г.

*УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»,  
кафедра судебной медицины*

**Резюме.** С целью установления давности наступления смерти (ДНС) определяли в динамике количество В-лимфоцитов методом розеткообразования с эритроцитарным анти-CD22 диагностикумом. Количество В-лимфоцитов, экспрессирующих рецепторы CD22, определяли в крови 10 трупов людей, умерших от механических травм и асфиксий. В ходе проведенных исследований выявлены статистически значимые изменения В-клеточного звена иммунитета со снижением В-лимфоцитов на протяжении до трех суток.

Снижение медианы для рецепторов, экспрессирующих CD22 на В-лимфоцитах в интервале времени 27-36 часов, составило 10% [25-ый и 75-ый процентиля - 8, 12], через 51-64 часов 4,5% [4, 5], 65-78 часов 2,5% [2, 3] ( $p < 0,001$ ) и спустя 17-26 часов 12% [10, 14], 37-50 часов после наступления смерти 8% [6, 9] ( $p < 0,01$ ).

Преимущество использования эритроцитарного диагностикума с моноклональными антителами для определения ДНС заключается в простоте метода и возможности проведения реакции в стандартных условиях.

**Ключевые слова:** давность наступления смерти, В-лимфоциты, фенотипирование с CD22 диагностикумом.

**Abstract.** To determine the remoteness of death the amount of B-lymphocytes was analyzed in dynamics by the method of rosetting with erythrocytic anti-CD22 diagnosticum. The quantity of CD22 expressing B-lymphocytes was determined in blood of 10 deceased who died of mechanical traumas and asphyxia. Our research revealed statistically significant changes in B-cellular component of immune system with the decrease of B-lymphocytes levels over up to three days period.

Median decrease for receptors, expressing CD22 on B-lymphocytes made up 10% [25th and 75th percentiles = 8, 12] at the interval of 27-36 hours after death; 4,5% [4, 5] 51-64 hours after death; 2,5% [2, 3] 65-78 hours after death ( $p < 0.001$ ); 12% [10, 14] 17-26 hours after death and 8% [6, 9] ( $p < 0.01$ ) 37-50 hours after death.

The advantage of using erythrocytic diagnosticum with monoclonal antibodies for the determination of the remoteness of death consists in the simplicity of this method and the possibility to perform the reaction under standard conditions.

**П**роблема определения давности наступления смерти (ДНС) была и продолжает оставаться одной из наиболее актуальных и сложных в судебной медицине

[1-4]. К настоящему времени разработан широкий спектр методов для определения ДНС, которые включают использование инструментальных методик [5], методов, построенных на изучении морфо-функциональных изменений, происходящих в органах, тканях и жидкостях трупа [6-8], а также методов, в основе которых лежит создание математических мо-

**Адрес для корреспонденции:** 210027, г. Витебск, ул. Чкалова, д. 11, корп. 10, кв. 91. Тел. моб.: 8 (029) 811-18-92 – Денисенко А.Г.

делей, позволяющих учитывать многообразие многих индивидуальных признаков [9-12]. Различными авторами [9-12] выявлены закономерности характера охлаждения ткани головного мозга трупа, в отличие от аналогичного процесса в печени и прямой кишке. Исследованиями [13] установлено, что для оценки времени наступления смерти можно использовать белковый сердечный маркер тропонин I.

Во многих работах оцениваются такие параметры трупной крови, как электролиты (натрий, калий, кальций, магний, фосфор, глюкоза), азотистые соединения (мочевина, креатинин), ферменты (кислая и щелочная фосфатаза, амилаза, лактатдегидрогеназа) [14-19].

Thomsen, H. [20] изучал количество тромбоцитов трупной крови в раннем посмертном периоде с помощью иммуногистохимических методов с использованием моноклональных CD61, антифибриногена и иммуноэлектронной микроскопии с моноклональными антителами. Выявлено, что первичное возрастание числа тромбоцитов в трупной крови было вызвано гипостатическим феноменом, и эти изменения вызывают потенциально обратимую адгезию преадсорбированного фибриногена на эритроцитах. Дальнейшее уменьшение числа тромбоцитов в посмертной крови объясняют снижением числа тромбоцитов, которые можно подсчитать в трупной крови.

Работа М.Л. Казарновской [21] посвящена вопросам оценки репродуктивной активности лимфоцитов трупной крови, отражающей прижизненное влияние различных физиологических и патофизиологических факторов, возможности использования установленных закономерностей в судебно-медицинской практике при определении срока наступления смерти, а также предшествовавшего ей эмоционального и физического состояния. Автором установлена обратная зависимость между продолжительностью агонального периода и давностью наступления смерти, с одной стороны, и интенсивностью репродукции лимфоцитов трупной крови – с другой.

Авторами [21-23] показано, что лимфоциты сохраняются в трупной крови до 72 часов, и определение их может быть использовано в качестве дополнительного критерия давности наступления смерти в ранние сроки после смерти.

Установлено, что в раннем посмертном периоде (до 3-х суток включительно) лимфоциты трупной крови отличаются от других клеточных ее элементов высокой устойчивостью к аутолитическому процессу и сохраняют способность участвовать в реакции бластотрансформации и розеткообразования. Это позволяет использовать их для установления сроков давности смерти [24-27]. Согласно данным Д.К. Новикова [28], использование метода “теофиллинчувствительности” для характеристики Тх и Тс является неприемлемым, так как нет корреляции его показателей с уровнем CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов и поэтому значение уменьшения розеткообразования под влиянием теофиллина остается неясным.

Нами [29] определялась функциональная активность нейтрофильных лейкоцитов для установления давности наступления смерти у 28 умерших: из них от ишемической болезни сердца – 13, от отравления этиловым алкоголем – 9 и от прочих причин смерти – 6. В результате изучения показателей (НСТ-теста и фагоцитоза) установлено статистически значимое снижение среднего значения показателей, что позволяет использовать полученные данные для определения давности наступления смерти. С помощью регрессионного анализа установлены зависимости определения давности наступления смерти от показателей спонтанного НСТ-теста и фагоцитарного индекса для лиц, умерших от ишемической болезни сердца.

Кроме того, в предварительных экспериментах нам удалось показать [30], что при исследовании крови в динамике от трупов людей, умерших от механических травм и асфиксий в результате повешения, отмечено достоверное снижение показателей Т-клеточного иммунитета с падением их общего количества: CD3 до 65-78 часов, CD4, CD8 и гиперэкспрессией к ИЛ-2 на Т-лимфоцитах – CD25 до 79-85 часов. Отмечено, что метод феноти-

пирования с эритроцитарными диагностикумами (CD3, CD8 и CD25) имеет максимальную статистическую значимость на протяжении длительного времени после смерти (до 79-85 часов) по сравнению с методом спонтанного розеткообразования. Отсюда он имеет преимущество при его использовании в судебно-медицинской практике.

В литературе не изучалось определение количества В-лимфоцитов в трупной крови, экспрессирующих рецепторы CD22 фенотипированием с помощью анти-CD диагностикума.

Целью нашего исследования было установление ДНС по изменению в динамике количества В-лимфоцитов методом фенотипирования с использованием анти-CD22 диагностикума.

### Методы

Исследовали кровь, взятую из правого отдела сердца и крупных сосудов у трупов людей, умерших от насильственной смерти (множественных травм и механических асфиксий в результате повешения) (10). Из них мужчин - 7, женщин - 3. Трупы находились в морге при температуре от 15 до 20°C (осенне-зимний период) и от 20 до 25°C (весенне-летний период).

Забор крови осуществляли стерильными шприцами из правого отдела сердца и бедренной вены в объеме по 10 мл. Последующие заборы крови от трупов осуществлялись с интервалами времени 7-16; 17-36; 27-36; 37-50; 51-64; 65-78; 79-85 час. Кровь обрабатывали методом розеткообразования с помощью эритроцитарного диагностикума (CD22) [31]. К крови в количестве 10 мл добавляли 0,1 мл гепарина, который был предварительно разведен в 0,9% растворе хлорида натрия (10 ЕД в 1 мл). Кровь центрифугировали 10 минут при 1000 об/мин, затем собирали образовавшуюся пленку, обогащенную нейтрофильными лейкоцитами, в пластиковую пробирку. К осадку лейкоцитов добавляли 1-1,5 мл 0,84% раствора хлористого аммония, предварительно прогретого в термостате до 37°C, лизировали эритроциты 1-

2 минуты, затем центрифугировали 2-3 минуты при 1000 об/мин. Надосадочную жидкость удаляли и к осадку добавляли 3-4 мл 0,9% р-ра хлорида натрия и потом центрифугировали при 1000 об/мин 5 минут. Процедуру отмывания повторяли с раствором Хенкса. После последнего отмывания осадок клеток ресуспензировали в 0,5 мл р-ра Хенкса. Проверляли суспензию клеток в камере Горяева на их жизнеспособность. Подсчитывали не менее 100 клеток, среди них определяли процент окрашенных (погибших). Затем проверяли суспензию клеток в камере Горяева, где доводили концентрацию лимфоцитов раствором Хенкса до  $2-2,5 \times 10^9$  кл/л (8-10 клеток в 1 квадрате камеры Горяева). Смешивали в равных объемах 0,1 мл 0,1% суспензию эритроцитарного диагностикума CD22 и взвесь лейкоцитов. Смесь инкубировали в термостате при 37°C 15 минут, затем центрифугировали при 1000 об/мин 1-2 минуты. К осадку клеток добавляли 0,1 мл 0,06% глютарового альдегида. После ресуспензирования оставляли на 1 минуту при комнатной температуре. Затем готовили мазки на предметных стеклах. После высыхания на воздухе мазки фиксировали 96° этанолом, которые окрашивали азур-эозином 10-15 минут. Подсчитывали процент розеткообразующих лимфоцитов, явно имевших не менее 3-х эритроцитов с анти-CD22 диагностикумом.

Статистическую обработку данных проводили с помощью электронных таблиц Excel 7.4. (Microsoft), Statgraphics 2.1. (Statistical graphics Corp.) и BIOSTAT.EXE. Так как распределение изучаемых величин отличалось от нормального, для описательного статистического анализа применяли показатель медианы, 25 и 75 процентиль [32]. При сравнении достоверности отличий между группами был использован U-критерий Манна-Уитни [32]. Статистически достоверными считали различия при  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

В группе умерших ( $n=10$ ) при определении количества В-лимфоцитов, экспрессирующих рецепторы CD22, отмечалось стати-

Таблица 1

**Показатели гуморального иммунитета у лиц, умерших от механических травм и асфиксий**

| Показатель<br>Процентили<br>25-75 | Время, прошедшее с момента наступления смерти (часы) |             |             |          |             |             |
|-----------------------------------|--|-------------|-------------|----------|-------------|-------------|
|                                   | 7-16   | 17-26       | 27-36       | 37-50    | 51-64       | 65-78       |
| CD22                              | 15(13-16)  | 12(10-14)** | 10(8-12)*** | 8(6-9)** | 4,5(4-5)*** | 2,5(2-3)*** |

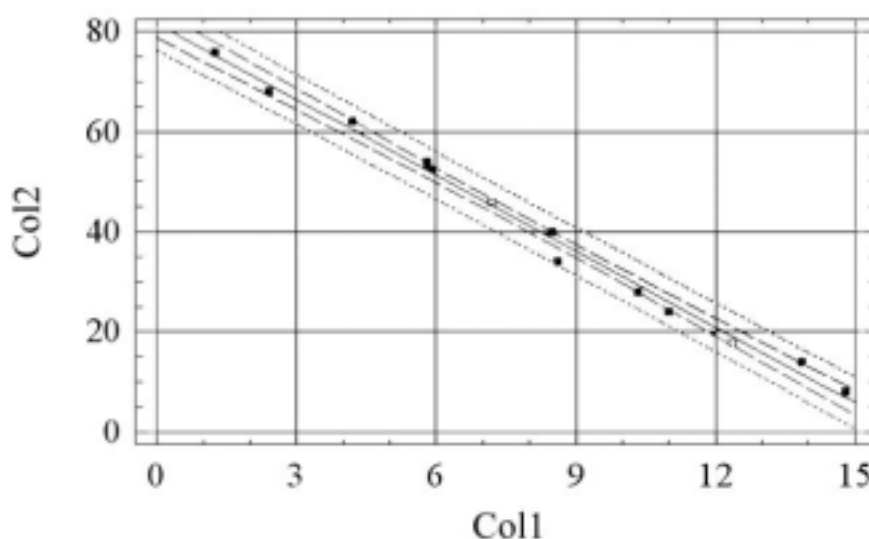


Рис. 1. Содержание В-лимфоцитов, экспрессирующих рецептор CD22.

Примечание: по оси X – среднее время наступления смерти, по оси Y- процент CD22 лимфоцитов.

стически значимое снижение этого показателя во всех интервалах времени (до 65-78 часов).

Снижение экспрессии рецептора CD22 на В-лимфоцитах (табл. 1) отмечалось в интервалах времени: 27-36 часов 10% [8,12], 51-64 часов 4,5% [4,5], 65-78 часов 2,5% [2, 3] ( $p < 0,001$ ) и спустя 17-26 часов 12% [10, 14], 37-50 часов после наступления смерти 8% [6, 9] ( $p < 0,01$ ).

Регрессионный анализ данных проводили с помощью программы Statgraphics 2.1.

В результате получили уравнение (1), по которому, зная процент содержания CD22 лимфоцитов, определяли срок ДНС.

$$t = 81,6148 - 40,46 \times a, \quad (1)$$

где  $t$  — ДНС;  $a$  – процент содержания CD22 лимфоцитов.

Построение осуществляли в линейной регрессионной зависимости. Коэффициент корреляции = -0,9961;  $p < 0,001$ .

Пример использования, предложенного нами метода.

Женщина, 44 года, умершая от множественных повреждений. Исследуется кровь в промежутке времени от 37 часов до 43 часов после наступления смерти. Исследованием определяем содержание В-лимфоцитов, экспрессирующих рецептор CD22 (8%). Используя формулу, находим, что с момента наступления смерти прошел 41 час.

### Заключение

В ходе проведенных исследований крови, в динамике от трупов людей, умерших в результате механических травм и асфиксий, отмечено статистически достоверное снижение содержания В-лимфоцитов. Такая динамика изменения экспрессии CD22 В-лимфоцитами сохраняется до трех суток, что имеет прикладное значение для судебно-медицинской практики.

Преимущество использования эритроцитарного диагностикума с моноклональными антителами для определения ДНС заключается в простоте метода и возможности проведения реакции в стандартных условиях.

### Литература

- Swift, B. Methods of time since death estimation within the early post-mortem interval / B. Swift // *The journal of Homicide and major incident investigation*. – 2010, Vol.6. – Is.1. – P. 97-112.
- Пиголкин, Ю.И. Современные методы определения давности наступления смерти / Ю.И. Пиголкин, Д.В. Богомолов, А.А. Коровин // *Судебно-медицинская экспертиза*. – 1999. – Т.42, № 3. – С. 31-33.
- Витер, В.И. Современное состояние проблемы давности наступления смерти / В.И. Витер, В.Ю. Толстоуцкий // *Казан. мед. журн.* – 1994. – С. 320-324.
- The estimation of the death en early postmortem period / C. Henssge [et al.]. – London: Edward Arnold, 2002. – 271 p.
- Evaluation of postmortem oxymetry with reference to the cause of death / H. Maeda [et al.] // *Forensic Science International*. – 1997. – Vol. 87. – P. 201-210.
- Comparison of morphological changes in white blood cells after death and in vitro storage of blood for the estimation of post-mortem interval / H. Dokgoz, N. Arican [et al.] // *Forensic Science International*. – 2001. – Vol.124, N 1. – P. 25-51.
- Mohammed, M.A. Blood Changes as a Possible Tool for Estimation of the postmortem Interval / M.A. Mohammed // *Thesis, faculty of medicine. Cairo University*. – 2004. – P. 43-44.
- Морфометрические подходы к диагностике давности наступления смерти / А.А. Коровин [и др.] // *Суд. мед. экспертиза*. – 2001. – № 1. – С. 3-5.
- Cataneo, C. Infrared tympanic thermography as a substitute for a probe in the evaluation of ear temperature for post-mortem interval determination: a pilot study / C. Cataneo // *Journal of Forensic and Legal medicine*. – 2009. – Vol.16. – P. 215-217.
- Особенности термометрического исследования трупа на месте его первоначального обнаружения / А.Ю. Вавилов [и др.] // *Проблемы экспертизы в медицине*. – 2005. – № 2. – С. 15-17.
- Вавилов, А.Ю. Судебно-медицинские аспекты посмертной гемодинамики: Монография / А.Ю. Вавилов, А.А. Халиков, С.В. Щепочкин. – Ижевск-Уфа: Экспертиза, 2004. – 80 с.
- Щепочкин, О.В. О перспективах посмертной термометрии головного мозга для определения давности наступления смерти / О.В. Щепочкин, А.Ю. Вавилов, А.Л. Костылев // *Труды молодых ученых ИГМА*. – Ижевск. экспертиза, 1999. – С. 21-23.
- Sabucedo, A.J. Estimation of the postmortem interval using the protein marker cardiac Troponin I / A.J. Sabucedo, K.G. Furton // *Forensic Science international*. – 2003. – Vol. 134, N 1. – P. 55-62.
- Querido, D. Linearization of the relationship between postmortem plasma chloride concentration and postmortem interval in rats / D. Querido // *Forensic Science International*. – 1990. – Vol.45, N 1. – 117 p.
- Untefer, S. Evaluation of an electrolyte analyzer for measurement of ionized calcium and magnesium concentrations in blood, plasma and serum of dogs / S. Untefer // *Am. J. Vet. Res.* 2004. – Vol.65, N 2. – P. 183-187.
- Decomposition chemistry of human remains: a new methodology for determining the post-mortem interval / A.A. Vass [et al.] // *Journal of Forensic Sciences*. – 2002. – Vol. 47, N 3. – P. 542-553.
- Schleyer, F. Todeszeitbestimmung in fruh-postmortalen Intervall / F. Schleyer // *Gerichtliche Medizin / Ed B. Mueller B.* – Berlin: Heidelberg. Springe, 1975. – Vol.1. – P. 55-62.
- Ботезату, Г.А. Посмертная динамика остаточного азота в сыворотке крови трупов лиц, погибших от травмы грудной клетки и живота / Г.А. Ботезату, Г.Х. Котеля, В.Г. Ункуца // *Вопросы судебной медицины экспертной практики*. – Чита, 1977. – С. 43-44.
- Ушаков, В.В. Динамика активности холинэстеразы трупной крови / В.В. Ушаков, А.М. Наумова // *Давность происхождения процессов и объектов суд.-мед. экспертизы и вопросы переживаемости тканей и органов*. – М.: 2 МОЛГМИ, 1973. – С. 22-23.
- How and why does the platelet count in postmortem blood change during the early postmortem interval / H. Thomsen [et al.] // *Forensic Science international*. – 1999. – Vol. 101, N 3. – P. 185-194.
- Казарновская, М.Л. Лимфоциты крови в условиях посмертного аутолиза / М.Л. Казарновская // *Репродукция лимфоцитов трупной крови*. – Кишинев: Штиинца, 1983. – С. 22-37.
- Bardale, R. Evaluation of morphological changes in blood cells of human cadaver for the estimation of postmortem interval / R. Bardale, R. Dixit // *Medical journal issues contents editorial board*. – 1999. – Vol. 7, N 2. – P. 1-6.
- Сафин, Р.Я. Применение иммунологических методов исследования трупной крови для определения давности наступления смерти / Р.Я. Сафин // *Есте-*

- ствознание и гуманизм: сб. науч. трудов; под ред. Н.Н. Ильинских. – Томск, 2006. – Т. 3, № 2. – С. 94-95.
24. Зависимость иммунных показателей крови умерших от заболеваний в динамике раннего посмертного периода / В.И. Костылев [и др.] // Вопросы теории и практики суд.-мед. экспертизы. – Запорожье, 1999. – С. 76-77
25. Костылев, В.И. Реакция лимфоцитов к бласттрансформации в ранние сроки после смерти / В.И. Костылев // Материалы II Все союз. съезда судебных медиков. – Иркутск, 1987. – С. 236-237.
26. Sebastiao, A.M. Посмертна динаміка вмісту імунних показників розеткоутворення крові осіб, що загинули від странгуляційної асфіксії / А.М. Sebastiao // Укр. судово-мед. вісник. – 2000. – № 2. – С. 26-27.
27. Костылев, В.И. Влияние алкоголя на состояние иммунных показателей при установлении давности наступления смерти / В.И. Костылев, Д.В. Костылев, О.В. Дунаев // Вісник МВС України. Спец. вип. – 1999. – № 2. – С. 43-45.
28. Новиков, Д.К. Клиническая иммунология / Д.К. Новиков, П.Д. Новиков. – Витебск: ВГМУ, 2006. – 392 с.
29. Денисенко, А.Г. Определение функциональной активности нейтрофильных лейкоцитов для установления давности наступления смерти / А.Г. Денисенко // Вестн. ВГМУ. – 2010. – Т. 9, № 2. – С. 161-166.
30. Денисенко, А.Г. Некоторые показатели Т-клеточного иммунитета в различные промежутки после наступления смерти / А.Г. Денисенко // Вестн. ВГМУ. – 2010. – Т. 10, № 4. – С. 146-152.
31. Новиков, Д.К. Методы определения Т- и В-лимфоцитов диагностикумами на основе моноклональных антител / Д.К. Новиков, П.Д. Новиков, В.В. Янченко // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2000. – № 2. – С. 31-33.
32. Реброва, О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. – М.: Медиа Сфера, 2006. – С. 9-312.

Поступила 22.01.2011 г.  
Принята в печать 18.02.2011 г.